Aus dem Hygienischen Institut der Universität zu Breslau.
Direktor: Prof. Dr. C. Prausnitz.

Bakteriologische und chemische Untersuchungen über die Natur eines dem Bakteriophagen ähnlichen Vorganges bei gewissen Stämmen des Bacillus pyocyaneus.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Medizin und Chirurgie der hohen Medizinischen Fakultät der Schlesischen Friedrich-Wilhelmsuniversität zu Breslau

vorgelegt von
HANS GERT MÜLLER.

Breslau 1933.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung
der medizinischen Fakultät
der Universität Breslau.

I. Referent: Professor Dr. Kollath.
II. „ „ „ Prausnitz.

Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543117_0059

Nach Lode zeigen ältere Pyocyaneus-Oberflächenkulturen nicht selten metallisch glänzende fleckförmige Aufhellungen, die sich besonders in durchfallendem Licht durch Transparenz auszeichnen. Die Flecken werden durch ein zartes Häutchen überdeckt, das durch seinen irisierenden Glanz schon 1899 Ruzicka auffiel. Okuda beschrieb dieselbe Erscheinung, bei der „am Rande oder in der Mitte des Belages Einsenkungen von runder, bei Zusammenfliessen mehrerer von unregelmässiger Form, auftraten; der Rasen verschwand innerhalb dieser nicht vollständig, sondern bildete, sehr verdünnt, ein silbern glänzendes, dünnes Häutchen". Er führt das auf die Wirkung eines Bakteriophagen zurück, eine Ansicht, die zuerst von Cancik bestätigt wurde.

Auch Hauduroy und Peyre glauben, dass die glänzenden Flecke von einem Bakteriophagen verursacht werden, obwohl die Erscheinung gegenüber dem Bakteriophagen Abweichungen aufweist.

Lode, Pesch und Sonnenschein stellten dann fest, dass an den schillernden Stellen bei schwacher Vergrösserung „zierliche büschel- oder sternförmige Kristalle" zu beobachten waren. Diese Autoren glauben, dass die Aufhellungen in irgend einem Zusammenhang mit den Kristallen stehen. Lode stellte weiter fest, dass die „irisierenden Flecke" auch auftraten, wenn Phagen sicher fehlten.

Dies bestätigen Cancik, Combiesco und Magheru, Pons und Quiroga. Quiroga isolierte aus Osteomyelitiseiter ein Pyocyaneuslysin und zeigte, dass der lysinresistente Stamm bedeutend virulenter war als der untersuchte. Schillernde Flecken beobachtete er dabei nicht. Lisch, der einige vorzügliche Abbildungen der Erscheinung bringt, erklärt, dass das Auftreten der schillernden Dellen auf zwei Vorgängen beruhe; die Ausbildung der „taches vierges" führt er auf eine Phagenwirkung zurück; das Auftreten der glänzenden Flecke sei ein Phänomen, das „ganz dem von Twort angegebenen ähnelt". Es gelang ihm aber nicht, die Charakteristika des Bakteriophagen, Filtrierbarkeit und Klärung der Bouillon, hervorzurufen. Asheshowa lehnt eine Phagenwirkung völlig ab; Pesch und Sonnenschein erkennen nur eine „bakteriophagenähnliche Erscheinung" an und bezeichnen sie als „Pseudo-Bakteriophagen".

Auch d'Hérelle selbst glaubt nicht, dass die Erscheinung mit dem nach ihm benannten Phänomen etwas zu tun hat; er denkt vielmehr an einen Zusammenhang mit der Farbstoffbildung.

Es ist bis jetzt nicht gelungen, zu beweisen, dass es sich um ein besonderes Agens handelt, das dem Bakteriophagen zwar ähnlich, aber doch nicht mit ihm identisch ist. Vor allem fehlen Versuche, die Natur und die Eigenschaften der Kristalle festzulegen. Es gibt in dieser Form keinen Bakteriophagen und hier lag eine Handhabe vor, etwas Genaueres auszusagen.

Vor etwa zwei Jahren beobachtete Herr Professor Dr. Kollath bei einem Pyocyaneusstamm auf Ascites-, Nähr- und Endoagar diese eigenartige Erscheinung.

Es entwickelten sich opalisierende Stellen, die bei schräg auffallendem Licht besonders deutlich hervortraten. Nach einigen Tagen war diese Erscheinung noch ausgeprägter, nach monatelangem Stehen bedeckte sich der ganze Bakterienrasen mit dem schillernden Überzug. Auf Endoagar hatte sich statt des blauen Pyocyanin ein roter Farbstoff gebildet.

Bei Durchsicht waren die schillernden Stellen heller als der übrige Bakterienrasen: Das liess sich auf die Entwicklung stecknadelkopf- bis hirsekorngrosser Dellen zurückführen, die auf ihrem Rand und Grund von opalisierenden Flächen bedeckt waren; der Rand zeigte dabei eine leichte Wallbildung, die unmittelbar umgebenden Partieen wiesen gegenüber einem von dieser Erscheinung nicht befallenen Pyocyaneusrasen bei gewöhnlicher Betrachtung keinen Unterschied auf.

Bei Betrachtung im Mikroskop zeigte sich, dass nicht nur die schillernden Stellen und Einsenkungen radiär angeordnete Kristalle enthielten, sondern dass auch in der übrigen Kultur ähnliche Kristalle, aber ungeordnet, auftraten.

Im polarisierten Licht wiesen alle Kristalle deutliche Doppelbrechung auf.

Dieses optische Verhalten gab der Arbeit einen Hinweis, in welcher Richtung eine chemische Identifizierung möglich war, denn es war ziemlich unwahrscheinlich, dass die Doppelbrechung auf eine besondere mechanische Anordnung in der Kultur zurückzuführen war. Es lag vielmehr die Möglichkeit vor, dass es sich um Lipoïde handelte.

Die Verimpfungsmöglichkeit und Vermehrungsfähigkeit in Subkulturen ergab folgender Versuch:

Versuch 1. (6 mal wiederholt)

Der Stamm, der die schillernden Stellen zeigte (positiver Stamm), wurde auf Agar weiterverimpft.

In dem dichten Bakterienrasen waren die glänzenden Flecken immer vorhanden. Sie waren sogar nach einigen Passagen noch deutlicher geworden. Ging man von dem Boden einer Delle aus, liessen sich die opalisierenden Einsenkungen kräftiger hervorrufen.

Ein Vergleich mit einem Stamm, der keinerlei Spur von opalisierenden Flächen zeigte (negativer Stamm), ergab, dass bei völlig gleichen Bedingungen der positive Stamm bei seinem Wachstum bedeutend weniger Farbstoff gebildet hatte als der negative Stamm, eine Beobachtung, die sich mit den Angaben der oben erwähnten Autoren nicht deckt, die alle darin übereinstimmen, dass das Auftreten der Erscheinung nur bei Stämmen beobachtet wurde, die einen besonders tief-blaugrünen Farbstoff bildeten. Das Wachstum des positiven Stammes war allerdings auch viel weniger üppig als das des negativen. Erwähnt werden soll noch, dass sich auch in den negativen Kulturen vereinzelt doppelbrechende Kristalle fanden.

Offenbar handelt es sich hier um eine Erscheinung, bei der eine übertragbare, dem Bakteriophagen ähnliche Bildung von „taches vierges" mit dem Auftreten von doppelbrechenden Substanzen kombiniert war.

So lag das Problem vor, inwiefern ein dem d'Hérelle'schen Phänomen ähnlicher Vorgang mit der Entstehung chemisch charakteristischer Substanzen zusammenhing.

Von Herrn Prof. Dr. Kollath bekam ich die fragliche Kultur mit der Aufgabe, eine Lösung dieses Problems zu versuchen.

Versuch 2. (3 mal wiederholt)

Wir impften einen positiven und einen negativen Stamm *) auf Endoagar und beobachteten, dass beide Stämme zunächst einen grünlichen Farbstoff bildeten, der nach einigen Tagen (2—3) einen allmählichen Übergang über rosa zu weinrot zeigte. Die Bildung des Farbstoffes war bei dem positiven Stamm bedeutend schwächer. Die opalisierenden Stellen waren auf Endoagar so viel deutlicher und intensiver, dass wir in der Folgezeit fast ausschliesslich mit Endoagar arbeiteten. Die Eigenschaften

*) Siehe vorhergehende Absätze.

dieses roten Farbstoffes studierten wir nun genauer, um festzustellen, ob es sich hier um eine Besonderheit in der Farbstoffbildung handelte oder ob die Rotfärbung durch das im Nährboden enthaltene Fuchsinrot hervorgerufen wurde.

Dazu stellten wir

Versuch 3 an. (3 mal wiederholt)

Wurde eine bewachsene, violettrote Endoplatte in kochendem Wasser aufgelöst, so zeigte sich bei Säurezusatz ein Farbumschlag zu gelb.

Es handelt sich bei der Bildung des roten Farbstoffes um eine Umwandlung des reinen Pyocyanins in das in alkalischer Lösung violettrote Hemipyocyanin, das von Wrede und Strack beschrieben wurde.

Dass es sich um das Wiederauftreten des Fuchsinrotes handelte, war unmöglich, weil die bewachsene Endoplatte bedeutend alkalischer war als die unbewachsene. Eine Änderung der Farbstoffbildung des Pyocyaneus auf Endoagar besteht also nicht.

Nun wurde versucht, mit den üblichen Färbungsmethoden eine Besonderheit der Bakterien, die von den freien und befallenen Stellen entnommen wurden, zu finden.

In Versuch 4 (3 mal wiederholt) wurden Ausstrich- und Klatschpräparate nach Hitzefixierung nach Gram, Giemsa und May-Grünwald gefärbt. Dabei zeigten beide Bacillenarten dasselbe färberische Verhalten.

Auch die Färbung nach feuchter Fixierung mit Sublimatalkohol nach Schaudinn lieferte kein Ergebnis.

Die Beweglichkeit im hängenden Tropfen war unverändert.

Morphologisch liess sich also keine Erklärung finden.

In Versuch 5 (3 mal wiederholt) wurde der positive Stamm auf eine Reihe von Nährböden verimpft, um festzustellen, wieweit die Erscheinung an Bestandteile der Nährböden gebunden war.

Nach 24stündiger Bebrütung waren die opalisierenden Flecken und Dellen zu beobachten bei:

Agar, Endoagar, Beckschem Nährboden (schwach) und Traubenzuckeragar (schwach).

Nach 48—72stündiger Bebrütung war die Erscheinung schwach auf Glyzerinagar zu sehen.

Auf Bierwürze-, Serum- und Neutralrotagar war sie überhaupt nicht zu erhalten.

Daraus ergab sich, dass der eigenartige Vorgang irgendeinen Zusammenhang mit Bestandteilen des Nährbodens haben musste.

Sodann wurde die Filtrierbarkeit des wirksamen Stoffes geprüft.

Versuch 6. (3 mal wiederholt)

Eine mit dem positiven Stamm gut bewachsene Agarplatte wurde mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült und die Abschwemmung durch eine Berkefeld-V-Filterkerze filtriert.

Nachdem das Filtrat auf seine Sterilität geprüft worden war, wurde es auf eine positive und negative Kultur gebracht, ohne sie irgendwie zu verändern.

Es handelt sich also um ein in wässriger Lösung nicht filtrierbares Agens. Dadurch unterschied es sich grundsätzlich von dem d'Hérelle'schen Bakteriophagen.

Versuch 7. (4 mal wiederholt)

Eine mit dem positiven Stamm bewachsene Endoplatte wurde mit Sudan III. übergossen und nach 24 Stunden mit Wasser abgespült. — Diese Methode hatten Kollath und Taubmann bei dem Studium der Staphylokokken-Hämolyse mit Erfolg benutzt. —

Die Endoplatte zeigte dabei keinen Befund: Die Sudanlösung war von keiner Stelle des Nährbodens angenommen worden.

Eine Fettspaltung ähnlich der bei der Staphylokokken-Hämolyse beobachteten mit Bildung von Fettseifen lag hier also nicht vor.

In Versuch 8 (4 mal wiederholt) wurden nun die reichlich gebildeten doppelbrechenden Kristalle von einer dicht bewachsenen Endoplatte abgekratzt und wie folgt verarbeitet:

1. Mit $^1/_1$ N Kalilauge versetzt: Die Kristalle wurden nicht verändert sondern behielten ihre Form und Doppelbrechung.

2. Mit Aether versetzt: Die Kristalle lösten sich, traten aber nach Eintrocknung wieder auf und behielten ihre Doppelbrechung.

3. Mit Chloroform versetzt: wie 1.

4. Mit Alkohol versetzt: wie 1.

5. Mit Wasser versetzt:

   a) Bei leichtem Erwärmen blieben Kristalle und Doppelbrechung erhalten.

   b) Bei starkem Erwärmen verschwanden die Kristalle, um beim Erkalten wieder aufzutreten. Sie zeigten auch wieder die Doppelbrechung.

6. Mit $^1/_1$ n Salzsäurelösung versetzt: Die Kristalle lösten sich und traten auch nach Eintrocknung nicht mehr auf.

Es handelt sich also um eine doppelbrechende Substanz, die in Aether löslich ist, bei starkem Erhitzen die Kristallform und die Doppelbrechung vorübergehend verliert, sie aber beim Erkalten wieder aufweist; in Salzsäure löst sie sich und verliert dabei Kristallform und Doppelbrechung endgültig. Die Kristalle stellen wahrscheinlich ein Lipoid oder einen lipoidartigen Körper dar.

Die Löslichkeit der doppelbrechenden Kristalle in Aether führte zu

Versuch 9. (5 mal wiederholt)

Mit Aether wurde eine Platte abgeschwemmt, auf der ein positiver Stamm 48 Stunden lang gewachsen war; die Abschwemmung wurde auf einem Objektträger eingetrocknet und zeigte doppelbrechende Kristalle. Sie machte aber, auf eine schon gewachsene Kultur gebracht, keine Veränderungen, gleichgültig, ob sie unkonzentriert oder im Vakuum bei Zimmertemperatur oder über dem Wasserbad eingeengt war.

Auch auf einer ganz frisch beimpften Platte hinterliess sie keine Spur.

Die Kristalle lösten sich also in Aether, waren aber in wirksamer Form von der Plattenkultur nicht zu erhalten.

Nachdem die Versuche auf gewöhnlichen festen Nährböden zu den obigen, neuen Ergebnissen geführt hatten, gingen wir nun zu flüssigen Nährböden über:

Versuch 10. (8 mal wiederholt)

Von Agar aus wurde der positive Stamm in eine Nährbouillon übertragen. Täglich wurde dann auf Endoagar zurückgeimpft.

Dabei ergab sich, dass die schillernden Dellen nach einigen Tagen (durchschnittlich vom 6. ab) an Deutlichkeit verloren während sie die Tage vorher so intensiv wie im Ausgangsmaterial auftraten. Durchschnittlich vom 20. Tage an waren sie völlig verschwunden, und es wuchs nur noch ein gewöhnlicher Pyocyaneus. *)

Der negative Stamm wuchs in der Bouillon kräftig weiter. Er zeigte weder, solange die Erscheinung vorhanden war, noch nachher eine Aufhellung. Dadurch unterschied sich der Vorgang wieder von dem Bakteriophagen.

In Versuch 11 wurde die Filtrierbarkeit des Agens untersucht. (4 mal wiederholt)

Eine 4 Tage alte Bouillon wurde mit dem positiven Stamm beimpft, 4 Tage bebrütet und dann durch ein Berkefeld-Filter geschickt. Das sterile Filtrat wurde auf eine positive und eine negative Kultur gebracht.

Auch dieses Filtrat veränderte den dichten Bakterienrasen in keiner Weise.

Dies ist wiederum ein Beweis, dass es sich hier nicht um das d'Hérelle'sche Phänomen handeln kann.

Nun wurde das Verhalten des positiven Stammes in einem synthetischen Nährboden untersucht, um vielleicht so festzustellen, welche chemischen Bestandteile für das Zustandekommen der Erscheinung notwendig sind.

Dazu wurde folgende, nach Braun und Goldschmidt hergestellte Lösung benutzt:

NH_4Cl	0,5	gr.
Na_2SO_4	0,5	„
$MgCl_2$	0,01	„
KH_2PO_4	0,05	„
K_2HPO_4	0,15	„
Natriumlactat	0,5	„
Aq. dest ad	100,0	„

*) Dieser umgewandelte Stamm diente als negativer Stamm, mit dem wir einen Teil der Versuche wiederholten, bis wir von einem Krankheitsfall einen positiven und einen negativen Stamm züchten konnten.

Dann wurde diese Lösung erst 60 und dann 30 Minuten lang sterilisiert, abgefüllt und mit den Gefässen noch einmal 30 Minuten lang entkeimt. Nach einer Probeimpfung erwies sich das PH (7,0—7,2) als ungeeignet für den Pyocyaneus, weshalb es auf 7,6 durch Zusatz von Natronlauge eingestellt werden musste.

Nun wuchs der Pyocyaneus kräftig.

Die synthetische Nährlösung wurde nun in

Versuch 12 (6 mal wiederholt) mit dem positiven Stamm beimpft. Der Stamm zeigte bei der Rückimpfung auf Endoagar genau das gleiche Verhalten wie bei Züchtung in der gewöhnlichen Nährbouillon.

Bei gutem, unveränderten Wachstum des Pyocyaneus wurden die opalisierenden Flecken vom 4. Tage an unscheinbarer und verschwanden vom 15. Tage an vollkommen, sodass auch hier nur noch ein negativer Stamm zu züchten war.

In Versuch 13 (6 mal wiederholt) wurde untersucht, ob aus der mit dem positiven Stamm bewachsenen synthetischen Nährlösung ein wirksamer Stoff zu filtrieren war. Nach 48 stündiger Bebrütung wurde sie durch ein Berkefeld-Filter filtriert und das sterile Filtrat auf eine positive und negative Kultur gebracht, wieder ohne eine Wirkung aufzuweisen.

Nun lag der Gedanke nahe, mit einem festen synthetischen Nährboden zu arbeiten. Deshalb wurde der Nährlösung Wasseragar zugesetzt und nach dem Erkalten wurden die Platten mit dem positiven Stamm in

Versuch 14 (8 mal wiederholt) beimpft.

Auch hier wuchs der Stamm gut, zeigte aber die Erscheinung nicht.

Irgendwelche Bestandteile des Nährbodens, wie sie die gewöhnliche Fleischwasser-Agar-Platte enthält, sind also für das Zustandekommen der Erscheinung erforderlich. Die Stoffe werden nicht von dem Bacillus aus seiner eigenen Substanz neu gebildet, sondern sind irgendwelche Umwandlungsprodukte von Nährbodenbestandteilen.

Deshalb werden in

Versuch 15 (5 mal wiederholt) dem festen und flüssigen synthetischen Nährboden 1 % Lecithin und 0,1 % Cholesterin zugesetzt, da möglicherweise diese Stoffe in den Nährplatten das Zustandekommen der Erscheinung bewirkt haben konnten.

Der als Lösungsmittel benutzte Alkohol wurde durch Erhitzen aus dem Milieu entfernt.

Nach Beimpfung mit dem positiven Stamm und nach 48 stündiger Bebrütung zeigten weder die Nährflüssigkeit noch die Wasseragarplatten bei gutem Wachstum des Pyocyaneus die Erscheinung.

Die zugefügten Substanzen reichten also nicht aus, weshalb in

Versuch 16 (4 mal wiederholt) beiden Nährböden 1 % Natriumsulfit zugesetzt wurde, das sich im Endo-Agar befindet. Auch diese Platte zeigte 48 Stunden nach Beimpfung mit dem positiven Stamm nur noch einen negativen Befund.

Es gelang also nicht, die schillernden Löcher in flüssigem oder festem synthetischen Nährboden, der durch Zusatz von Lecithin, Cholesterin und Natriumsulfit ergänzt worden war, zu erhalten.

Da es jetzt als aussichtslos erschien, verschiedene andere Zusätze zu machen, bis man durch Zufall auf den richtigen Stoff und die richtige Konzentration gekommen wäre, versuchten wir nun, die Träger des wirksamen Stoffes aus der Nährbouillon durch fraktionierte Extraction zu gewinnen.

Versuch 17. (2 mal wiederholt)

2 Liter einer Nährbouillon wurden mit dem positiven Stamm beimpft. Nach 5 Tagen, also zu einer Zeit, zu der auch in der Bouillon die Erscheinung noch vorhanden war, zeigte die Nährflüssigkeit bei Durchschütteln mit Luft, dass sich Farbstoff in grossen Mengen gebildet hatte.

Dann wurde nach Wrede und Strack zunächst das Pyocyanin mit Chloroform extrahiert.

A. Jede Bouillon wurde 4 mal mit Chloroform ausgeschüttelt und die Chloroformlösung durch Scheidetrichter von der übrigen Bouillon getrennt. Nun wurde der Chloroformlösung Salzsäurewasser zugesetzt, bis sich das salzsaure, weinrote, wasserlösliche Pyocyanin gebildet hatte. Die wässrige Lösung wurde vom Chloroform getrennt. Dann wurde ihr Alkali zugesetzt, bis ein völliger Farbumschlag zu einem reinen Blau eingetreten war. Es hatte sich wieder das blaue chloroformlösliche Pyocyanin gebildet, das mit Chloroform extrahiert, abgetrennt und dadurch gereinigt wurde. Dies ist Fraktion I.

B. Dem Bouillonrest wurde nochmals Chloroform zugesetzt.

Nach dreistündigem Stehen hatten sich abgesetzt:

I. Eine untere Schicht: sie enthielt die in Chloroform gelösten Reste des Pyocyanins und wurde wie Fraktion A. verarbeitet und ihr zugesetzt.

II. Eine mittlere Schicht: Sie war schmal, milchigtrüb, weisslich. Diese Emulsion wurde mit Aether extrahiert und abgetrennt.

Nach mehrstündigem Stehen hatte sie sich in zwei Schichten gesondert:

a) eine obere, klare, grüne,

b) eine untere, weissliche, getrübte.

Die klare, grüne Lösung ist Fraktion II a, die trübe, weissliche ist Fraktion II b.

C. Eine obere Schicht, die sich spontan sonderte in

a) eine obere, klare, Fraktion III.

b) eine untere, schmutzig-braune, Fraktion IV.

Versuch 18. (3 mal wiederholt)

Die fünf Fraktionen wurden auf Objektträgern eingetrocknet und in polarisiertem Licht untersucht. Nur die Rückstände von Fraktion II a und II b enthielten die doppelbrechenden Kristalle, II b wesentlich mehr als II a.

Nun wurden die Fraktionen mit gewachsenen Kulturen in Berührung gebracht:

In Versuch 19 (3 mal wiederholt) wurde auf eine 24 Stunden alte positive und negative Kultur je ein Tropfen folgender Lösungen gebracht:

1. Reines Chloroform.
2. Fraktion II a.
3. Fraktion II b.
4. Reiner Aether.
5. Fraktion I.
6. Chloroformwasser.
7. Fraktion III.
8. Fraktion IV.

Nach 24 Stunden zeigten die Platten keinen Befund. Nach 48 Stunden war an der Stelle, auf die Fraktion II b getupft worden war, das Bakterienwachstum lokal gehemmt. Im dichten Bacterienrasen war eine seichte Delle, die ein wenig opalisierte und bei Betrachtung im Polarisationsmikroskop doppelbrechende Kristalle enthielt.

Nun wurde in Versuch 20 (6 mal wiederholt) eine mit dem positiven und negativen Stamm eben beimpfte Endoplatte wie oben betupft.

Nach 24 Stunden hatten Fraktion II a und II b das Bakterienwachstum völlig unterbunden. Die Kulturen hatten an den Stellen der Betupfung Löcher, die doppelbrechende Kristalle enthielten und vollkommen bakterienfrei waren. Bei Fraktion II b waren die Kristalle in grösserer Menge vorhanden und die Dellen waren umfangreicher.

Der negative Stamm war dem Stoff gegenüber empfindlicher als der positive.

In Versuch 21 (3 mal wiederholt) wurde die Übertragbarkeit von Kultur zu Kultur untersucht: Von einem durch Fraktion II b verursachten Loch wurde mit einer Glasnadel schillernde Substanz abgenommen und auf eine mit dem negativen Stamm frisch beimpfte Platte getupft: die Kultur wuchs unverändert. Die hemmende Wirkung war also in der Subkultur nicht mehr hervorzurufen.

Auch das ist ein wichtiger Unterschied gegenüber dem Bakteriophagen. Wir dürfen daraus schliessen, dass die doppelbrechenden Kristalle nur Stoffwechsel-Endprodukte sind, die bei der fortzüchtbaren Eigenschaft der Lochbildung in besonderer Menge entstehen.

Versuch 22 (3 mal wiederholt) zeigte, dass das Agens nicht kochbeständig ist.

Die gelösten Fraktionen II a und II b werden 10 Minuten lang im kochenden Wasserbad gehalten.

Nach Auftupfung auf eine frisch beimpfte Endoplatte erschien nach 24 Stunden auf der Platte keine Lochbildung mehr. Die Wirkung war also beim Kochen verloren gegangen.

Versuch 23. (3 mal wiederholt)

Nun werden kleinere Portionen von Fraktion II b mit den üblichen Fettlösungsmitteln versetzt:

1. Aceton löste die Fraktion bis auf einen kleinen Rest, der zu Boden sinkt, vollständig.

2. Die Aetherlösung zeigte Zweischichtung:
   a) eine klare obere Schicht,
   b) eine trübe, untere.

3. Auch in der Petrolaetherlösung hatten sich
   a) eine obere klare und
   b) eine untere trübe Schicht abgesetzt.

4. In der Chloroformlösung hatten sich ebenfalls zwei Schichten gebildet.
   a) eine trübe, obere und
   b) eine klare untere.

Die Lösungen und die reinen Lösungsmittel wurden auf eine frisch beimpfte Endoplatte getupft.

Alle Fraktionen mit Ausnahme der reinen Lösungsmittel und der oberen, klaren Petrolaetherlösung hatten in den dichten Bakterienrasen an den Kontaktstellen bakterienfreie Löcher verursacht, die die doppelbrechenden Kristalle enthielten.

Während es also ohne Vorbehandlung der Kulturen nicht gelang, die wirksamen Kristalle aus dem Nährboden zu bekommen, erhielt man sie nach der fraktionierten Extraktion.

Das bedeutet wohl, dass nach der Fraktionierung andere Löslichkeitsverhältnisse für den wirksamen Stoff bestehen. Jetzt gelang es auch, den wirksamen Stoff zu filtrieren.

Versuch 24. (3 mal wiederholt)

Die Acetonlösung wurde durch einen Berkefeld-Filter filtriert und dann auf eine frisch beimpfte Endoplatte getupft.

An der Kontaktstelle wuchsen die Bakterien. Auch die Filtrierbarkeit des wirksamen Stoffes dürfte auf die veränderte Lösbarkeit in Fettlösungsmitteln zurückzuführen sein, denn es gelang nie, einen wirksamen Stoff in wässriger Lösung zu filtrieren.

Diskussion. Es ist also gelungen, nachzuweisen, dass die beobachtete Erscheinung sich sehr erheblich von dem d'Hérelle'schen Phänomen unterscheidet und im Sinne von Lisch aus zwei verschiedenen Teilen besteht:

1. Die Entstehung der Löcher hängt mit der Entstehung der doppelbrechenden Substanzen insofern zusammen, als sich in den Löchern Kristalle in besonders grosser Menge finden. Die dem d'Hérelle'schen Phänomen ähnliche Ausbildung von „taches vierges" geht also nicht unbedingt mit der Entwicklung der doppelbrechenden Kristalle einher.

2. Aber auch die Entstehung der Löcher lässt sich nicht schlechthin mit der Annahme erklären, dass es sich um den Bakteriophagen handelt, denn es fehlen die für ihn charakteristischen Eigenschaften: es fehlt die Filtrierbarkeit in wässriger Lösung oder aus bewachsener Bouillon, es fehlt die Phagenwirkung in der Bouillon, es fehlt die Übertragbarkeit in der typischen Form.

Wenn es auch nicht gelungen ist, die Entstehung der Löcher zu erklären, so haben unsere Versuche doch wenigstens ergeben, dass die schillernden Kristalle doppelbrechend sind und von dem Bakterium aus Substanzen produziert werden, die im Fleischwasser als Rohmaterial vorhanden sind. Ausserdem ist es uns gelungen, sie in wirksamer Form in Aetherlösung konzentriert darzustellen. Damit ist die Möglichkeit gegeben, sie chemisch zu identifizieren.

Dann sehen wir, dass es sich nicht um „Lebewesen" oder Fermente handeln kann, die etwa mit den chemischen Substanzen zusammen vorkommen, worauf die Hitzeempfindlichkeit beruhen könnte. Dagegen spricht die Löslichkeit in Fettlösungsmitteln, denn eine echte Löslichkeit von Lebewesen oder Fermenten in Fettlösungsmitteln gibt es nicht.

Wahrscheinlich besteht eine Art Gewöhnung an diese chemischen Stoffe, denn darauf könnte es beruhen, dass der negative Stamm dem Agens gegenüber empfindlicher war als der positive.

Es wird Gegenstand weiterer Arbeiten sein, welche speziellen chemischen Stoffe oder Verbindungen hier vorliegen und wie sich die interessante „Fraktion II b" anderen Bakterienarten und Versuchstieren gegenüber verhält.

Zusammenfassung:

1. Beim Bacillus pyocyaneus findet man gelegentlich eine Ausbildung von flachen Dellen, in denen sich glänzende Kristalle entwickeln. Das Phänomen hat eine gewisse Ähnlichkeit mit dem d'Hérelle'schen Phänomen, ist ihm aber nicht gleichzusetzen.

2. Es wurde untersucht, welche chemischen Eigenschaften die entstandenen Kristalle haben. Sie sind löslich in Aether, Chloroform, Aceton und zeigen deutlich im polarisierten Licht Doppelbrechung.

3. Auf einen bereits angegangenen Kulturrasen gebracht, wirken sie nicht; bei gleichzeitiger Beimpfung verhindern sie lokal das Wachstum. Sie lassen sich aus solchen Stellen nicht fortzüchten.

4. Es handelt sich um lipoidähnliche Produkte, die bei dem Wachstum in der Platten- und Bouillonkultur gebildet werden. Es wird versucht, die Natur der Substanzen genauer zu definieren.

Ich möchte diese Arbeit nicht abschliessen, ohne auch an dieser Stelle Herrn Professor Dr. Kollath meinen herzlichsten Dank auszusprechen. Herr Professor Kollath gab mir Anregung und Material zu den vorliegenden Untersuchungen und stand mir während zweier Jahre stets mit Rat und Tat hilfsbereit zur Seite.

Literaturnachweis.

1. Lode. „Bacillus pyocaneus". Kolle-Wassermann, Handbuch der path. Mikroorganismen. 1929, Bd. VI. S. 153.
2. Okuda. „Über Pyocaneusbakteriophagen". Arch. f. Hyg. 1923, Bd. 92, S. 109.
3. Hauduroy u. Peyre. C. r. Soc. Biol. 1923, Bd. 88, S. 688.
4. Lode. „Hemmung der Bakteriophagenwirkung beim Bac. pyocyaneus". Arch. f. Hyg. 1924, Bd. 92, S. 267.
5. Pesch und Sonnenschein. „Variabilität des Bakteriophagen beim Bac. pyocyaneus". Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 33, S. 1585.
6. Pons. „Bactériophage du bacille pyocyanique". C. r. Soc. Biol. 1923, Bd. 89, S. 77.
7. Combiesco u. Magheru. „Sur la lyse du bacille pyocyan". C. r. Soc. Biol. 1923, Bd. 88, S. 912.
8. Quiroga. „Baktériophage du bac. pyocyan". C. r. Soc. Biol. 1923. Bd. 88, S. 363.
9. Lisch. „Über die sogenannten Pyocyaneusbakteriophagen". Centr. f. Bakt. etc. I. Orig. Bd. 93 (1924), S. 421.
10. Irrna Asheshowa. „Le bactériophage du bac. pyocyan. et les taches irisées". C. R. Soc. Biol. 1926, Bd. 95, S. 1026 ff.
11. D'Hérelle. The bakteriophage and its behavior. 1926. S. 268.
12. Čančik. Čaopiś lékařův českych, 1923. S. 7.
13. Čančik. Ebenda. S. 2.
14. Wrede u. Strack. Ztschr. phys. Chem. Bd. 140, S. 1. (1924.)
15. Wrede u. Strack. Ebenda. Bd. 177, S. 177 (1928).